

学校编码: 10384

学号: 21720081152615

分类号__密级__

UDC__

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

Toll 样受体 3 中 TIR 结构域的结构学研究

Structural study of the TIR domain from Toll-like receptor 3

耿艳艳

指导教师姓名: 林天伟 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 04 月

论文答辩时间: 2011 年 05 月

学位授予日期: 2011 年 07 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题
(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实
验室的资助,在()实验室完成。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ☒ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 2014 年 9 月 1 日解密，解密后适用上述授权。

（ ☐ ） 2.不保密，适用上述授权。

声明人（签名）：

年 月 日

摘 要

Toll 样受体 3 (TLR3) 作为 Toll-like receptors (TLRs) 家族的一员, 在抗病毒的天然免疫反应和诱导产生获得性免疫反应中发挥重要作用。它可以识别病毒的双链 RNA, 通过产生 I 型干扰素以及引起树突状细胞介导的 NK 细胞和 T 细胞的激活来抵抗病毒的入侵。TIR 结构域是 Toll 样受体家族和胞内的衔接蛋白所共有的高度保守的结构域, 它通过介导受体和衔接蛋白之间的相互作用进行信号传导, 因此在天然免疫反应和炎症反应中起到关键的作用。TLR 的信号传导途径被含有 TIR 结构域的衔接蛋白调控, 如 MyD88, MAL, TRIF 和 TRAM, 与不同的下游衔接蛋白的相互作用使得各种 TLR 介导的信号传导途径具有特异性。在人体内, 除 TLR3 外, 其余的 TLRs 都会利用衔接蛋白 MyD88 进行下游的信号传导, 而 TLR3 则利用 TRIF 进行下游的信号传导, 激活不同的转录因子如 NF- κ B, AP-1 和 IRF 以引起不同的免疫反应。因此解析 TLR3 的 TIR 结构域的结构、TLR3 与其下游衔接蛋白 TRIF 的 TIR 结构域复合物的结构对进一步解释 TLR3 信号传导的特殊性具有重要意义。

本课题主要通过分子克隆技术, 将 TLR3 的 TIR domain 的基因序列构建到原核表达载体 pET-22b 和 pET-28a 中。采用原核表达系统, 通过改变表达菌株、诱导浓度和诱导温度对表达条件进行摸索, 最终得到可溶的目的蛋白。选择亲和层析和凝胶过滤层析对目的蛋白进行纯化并摸索使目的蛋白溶解度提高的缓冲液, 最后采用气相扩散法对目的蛋白进行结晶条件的初筛和优化。

经过表达和纯化等实验的摸索, 目前已经得到纯度较高的浓度为 10mg/ml 的目的蛋白, 正在进行晶体生长的初筛阶段, 已经得到一些利于蛋白晶体生长的条件, 为后续的晶体生长优化阶段奠定基础。

关键词: 天然免疫; Toll 样受体 3; TIR 结构域

ABSTRACT

Toll-like receptor 3 (TLR3) is a member of the Toll-like receptor (TLR) family and plays a vital role in antiviral innate immune responses, as well as the subsequent induction of adaptive immune responses. TLR3 recognizes viral double-stranded RNA and serves to protect the host against viral infection by the induction of a range of responses including type I IFN production and DC-mediated activation of NK cells and CTLs. The Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain is a highly conserved signaling domain found in the intracellular regions of Toll-like receptors (TLRs) and in several cytoplasmic adaptor proteins. TIR domains mediate receptor signal transduction through recruitment of adaptor proteins and play critical roles in the innate immune response and inflammation. TLR signaling pathways are finely regulated by TIR domain-containing adaptors, such as MyD88, MAL, TRIF and TRAM. Differential utilization of these TIR domain-containing adaptors provides specificity of individual TLR-mediated signaling pathways. In human, most TLRs recruit MyD88 to mediate signal transduction except TLR3 which interacts with the adaptor protein TRIF and activates various transcription factors such as nuclear factor NF- κ B, activating protein-1 and interferon regulatory factors, driving a specific immune response. Structural analysis of TIR domain of TLR3 and the complex of TIR domain of TLR3 and TRIF will be critical in signal transduction by TLR3.

This study mainly focuses on the expression, purification, and crystallization of TIR domain of TLR3. Different length of TIR domain fragments were cloned in vector pET-22b and pET-28a, and soluble protein was expressed using prokaryotic expression system. The protein was purified by affinity chromatography and gel chromatography and screened for suitable crystallization conditions by vapour diffusion, which sets the foundation for the structural characterization of TLR3-TIR.

Key Words: Innate Immunity; TLR3; TIR domain

目 录

摘 要.....	I
ABSTRACT.....	II
目 录.....	III
CONTENTS.....	VI
1 前言.....	1
1.1 天然免疫反应的识别.....	1
1.1.1 天然免疫反应的识别机制.....	1
1.1.2 天然免疫系统中的模式识别受体.....	2
1.2 Toll 样受体.....	5
1.2.1 Toll 样受体成员及配体.....	5
1.2.2 TLR 信号传导途径中含有 TIR 结构域的衔接蛋白.....	6
1.2.3 Toll 样受体的信号传导.....	8
1.3 Toll 样受体 3 的研究进展.....	10
1.3.1 TLR3 的表达和亚细胞定位.....	10
1.3.2 TLR3 对 dsRNA 的识别.....	11
1.3.3 TLR3-TRIF 的信号传导途径.....	13
1.4 本课题的研究目的及意义.....	15
2 实验材料与方法.....	17
2.1 实验材料.....	17
2.1.1 质粒和菌株.....	17
2.1.2 常用试剂.....	17
2.1.3 培养基和主要溶液的配制.....	17
2.1.4 主要仪器.....	23
2.2 实验方法.....	25
2.2.1 目的基因的克隆.....	25
2.2.2 目的蛋白的诱导表达及检测.....	31
2.2.3 目的蛋白的纯化.....	32

2.2.4 目的蛋白的结晶	35
3 实验结果	36
3.1 TLR3-TIR-22b-TEV 的克隆表达及纯化	36
3.1.1 目的基因的扩增及回收	36
3.1.2 重组质粒 TLR3-TIR-22b-TEV 的鉴定	37
3.1.3 TLR3-TIR-22b-TEV 的诱导表达	37
3.1.4 TLR3-TIR-22b-TEV 的纯化	38
3.1.5 TLR3-TIR-22b-TEV 的结晶	42
3.2 TLR3-TIR-22b-TEV-F⁻的克隆表达及纯化	42
3.2.1 定点突变	42
3.2.2 TLR3-TIR-22b-TEV-F ⁻ 的纯化	43
3.2.3 TLR3-TIR-22b-TEV-F ⁻ 的结晶	48
3.3 TLR3-TIR (NCBI) -22b 的克隆表达	48
3.3.1 目的基因的扩增及回收	48
3.3.2 重组质粒 TLR3-TIR (NCBI) -22b 的鉴定	49
3.3.3 TLR3-TIR (NCBI) -22b 表达	49
3.4 TLR3-TIR-22b 的克隆表达及纯化	51
3.4.1 定点突变	51
3.4.2 TLR3-TIR-22b 的纯化	52
3.4.3 TLR3-TIR-22b 的结晶	54
3.5 TLR3-TIR-28a 的克隆表达及纯化	55
3.5.1 目的基因的扩增及回收	55
3.5.2 重组质粒 TLR3-TIR-28a 的鉴定	55
3.5.3 TLR3-TIR-28a 的诱导表达	56
3.5.4 TLR3-TIR-28a 的纯化	57
3.5.5 TLR3-TIR-28a 的结晶	58
4 分析与讨论	59
5 小 结	61
参考文献	62

附录.....	67
致 谢.....	69

厦门大学博硕士论文摘要库

CONTENTS

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English	II
Contents in Chinese	III
Contents in English.....	VI
1 Introduction.....	1
1.1 Recognition of innate immune response.....	1
1.1.1 Recognition strategies of innate immune response	1
1.1.2 Pattern recognition receptors in innate immune system	2
1.2 Toll-like receptors	5
1.2.1 Members of TLRs and their ligands	5
1.2.2 TIR-domaincontaining adaptors in Toll-like receptor signalling	6
1.2.3 TLR signaling pathway.....	8
1.3 Advances in TLR3 research.....	10
1.3.1 Expression and subcellular localization of TLR3.....	10
1.3.2 Recognition of dsRNA by TLR3	11
1.3.3 TLR3-TRIF signalling pathways.....	13
1.4 Purpose and significance of reserach.....	15
2 Materials and methods	17
2.1 Materials.....	17
2.1.1 Plasmids and strains.....	17
2.1.2 Common reagents	17
2.1.3 Preparation of culture medium and major solution.....	17
2.1.4 Key instruments	23
2.2 Methods	25
2.2.1 Cloning of objective gene	25
2.2.2 Expression and detection of objective protein.....	31
2.2.3 Purification of objective protein	32
2.2.4 Crystallization of objection protein	35
3 Results	36
3.1 Cloning, experssion and purification of TLR3-TIR-22b-TEV.....	36
3.1.1 PCR and recovery of objective gene	36

CONTENTS

3.1.2	Identification of recombinant plasmid TLR3-TIR-22b-TEV	37
3.1.3	Expression of fusion protein TLR3-TIR-22b-TEV	37
3.1.4	Purification of fusion protein TLR3-TIR-22b-TEV	38
3.1.5	Crystallization of TLR3-TIR-22b-TEV	42
3.2	Cloning, experssion and purification of TLR3-TIR-22b-TEV-F⁻	42
3.2.1	Point mutation.....	42
3.2.2	Purification of fusion protein TLR3-TIR-22b-TEV-F ⁻	43
3.2.3	Crystallization of TLR3-TIR-22b-TEV-F-	48
3.3	Cloning and experssion of TLR3-TIR (NCBI) -22b.....	48
3.3.1	PCR and recovery of objective gene	48
3.3.2	Identification of recombinant plasmid TLR3-TIR (NCBI) -22b.....	49
3.3.3	Expression of fusion protein TLR3-TIR (NCBI) -22b	49
3.4	Cloning, experssion and purification of TLR3-TIR-22b	51
3.4.1	Point mutation.....	51
3.4.2	Purification of fusion protein TLR3-TIR-22b	52
3.4.3	Crystallization of TLR3-TIR-22b.....	54
3.5	Cloning, experssion and purification of TLR3-TIR-28a.....	55
3.5.1	PCR and recovery of objective gene	55
3.5.2	Identification of recombinant plasmid TLR3-TIR-28a	55
3.5.3	Expression of fusion protein TLR3-TIR-28a	56
3.5.4	Purification of fusion protein TLR3-TIR-28a	57
3.5.5	Crystallization of TLR3-TIR-28a	58
4	Discussion	59
5	Conclusion	61
	References	62
	Appendix	67
	Acknowledge.....	69

1 前言

1.1 天然免疫反应的识别

免疫系统是由负责维持机体稳态和抵抗病原体入侵的器官，细胞和分子构成的一个错综复杂的网络系统。从功能上可以分为天然免疫（又称非特异性免疫）和获得性免疫（又称适应性免疫）两种。天然免疫是生来就有的，包含很多非特异性因子，几乎对所有的危害机体的物质都有防御作用，产生快速的非特异性免疫反应，是对抗病原体感染的第一道防线。

1.1.1 天然免疫反应的识别机制

天然免疫反应的首要任务就是区分自身和非自身的物质，主要通过三种识别机制实现，分别是非自身微生物的识别、自身缺失的识别、自身变异的识别（见图 1-1）^[1]。

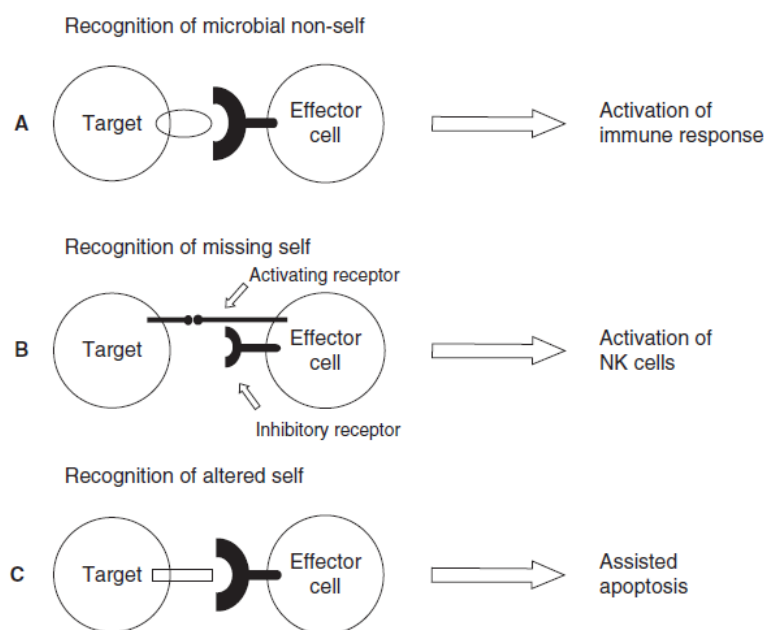


图 1-1. 天然免疫反应的三种识别机制

Fig.1-1.Three recognition strategies used by the innate immune defense

资料来源: Ingrid-Maria Bergman. Upsala Journal of Medical Sciences. 2011; Early Online, 1–10

非自身微生物的识别基于模式识别受体（pattern recognition receptors & PRRs）和病原相关分子模式（pathogen-associated molecular patterns & PAMPs）的相互作用。病原相关分子模式主要是指一类病原微生物所共有的高度保守的分子

结构，如 G⁺菌的脂多糖，G⁻菌的寡肽糖和真菌的酵母多糖等；是病原体生存所必须的所以不易被丢失，其在宿主内没有，但在病原微生物中分布广泛。模式识别受体由有限数量的胚系基因编码，进化上十分保守，也表明此类受体对生物体的生存极为重要。其可与病原生物表面的病原体相关分子模式的相互识别和作用而启动固有免疫应答的关键。和适应性免疫中淋巴细胞受体相比较，模式识别受体有四个特点，除了全部由胚系基因编码外，另外三个特点是：组成性地普遍表达、引起快速应答和能够识别各种病原体^[2]。

自身缺失的识别机制是基于正常细胞表达的一些分子标记，如果这些标记丢失后，该细胞就被当成破坏的对象。以 NK 细胞为例，NK 细胞通过细胞表面的激活受体和抑制受体和靶细胞相互作用，当两种受体都被结合时，抑制受体占主导地位，即 NK 细胞处于抑制的状态。但当靶细胞自身的分子标记丢失后，NK 细胞的抑制受体缺失了配体，从而使 NK 细胞从抑制状态中释放出来成为激活态。众所周知，组织相容性复合物 I（MHC I）在所有有核的细胞中都有表达，它可以和 NK 细胞上的抑制受体结合，从而使 NK 细胞一直处于抑制状态。而在被病毒感染的细胞和肿瘤细胞上，则缺失了 MHC I 的表达，此时 NK 细胞就被激活，产生杀伤作用。相反，自身变异的识别机制是基于不正常的细胞表达的一些分子标记，这些标记可以使得靶细胞成为被消除的对象，引起细胞凋亡^[3]。

1.1.2 天然免疫系统中的模式识别受体

非自身微生物的识别完全依赖于天然免疫系统中的模式识别受体（见图 1-2），这些受体根据分布位置可以分为两大类，一类是表达在细胞膜上的受体，包括识别细菌、病毒、原生物和真菌的 Toll 样受体（TLRs）和识别真菌的 C 型外源凝集素受体（CLRs）；另一类是表达在胞内的受体，包括识别病毒核酸的 RIG-I 样受体（RLRs）和依赖于 DNA 的激活干扰素调节因子的受体（DAI）以及识别细菌产物的结合核苷酸的含有亮氨酸重复区（LRR）的受体家族（NLRs）。这些受体识别保守的病原相关分子模式，经过信号传导最终导致一些编码调控免疫反应的重要因子的基因的表达，引起复杂的免疫反应从而清除入侵的病原体^[4]。

RLRs 和 DAI 识别病毒的 RNA 或 DNA。RNA 被 RLR 家族识别，包括两个成员，维甲酸诱导基因 I（RIG-I）和黑素瘤分化相关基因 5（MDA5），其相关家族的一个成员 LGP2 可能通过隔绝 RNA 来负调控这些受体。RIG-I 识别 5'端三磷



Fig.1-2. Innate immunity: sensing and signaling

资料来源: Eicke Latz and Katherine A. Fitzgerald. Innate immunity: sensing and signaling [EB/OL]. <http://www.nature.com/nri/poster/innate>, 2008/2011-04-06.

化的 RNAs, 而 MDA5 则识别双链的 RNA。包含三重模块的 E3-泛素化连接酶 (TRIM25) 对 RIG-I 的磷酸化是 RIG-I 发挥功能所必需的。RLRs 具有招募细胞凋亡蛋白酶的结构域 (CARD) 结构域, 可以和连在线粒体上的衔接蛋白 VISA 相互作用, VISA 通过和 TRAF3 相互作用激活 IRF3 和 IRF7, 还可以通过 FADD 和细胞凋亡蛋白酶 10 (caspase-10) 激活 NF- κ B^[4]。dsDNA 被 DAI 结合, 通过 TBK1 来激活干扰素调控因子 3 (IRF3)。

TLRs 是存在于细胞质膜和核内体上的一类 I 型的跨膜受体。一旦结合配体, 它们依靠 TIR-TIR 的相互作用来招募衔接蛋白。TLR5, TLR7, TLR8 和 TLR9 的信号传导主要依靠骨髓样分化初级反应基因 88 (MyD88), 而 TLR1, TLR2 和 TLR6 还需要 MyD88 衔接样蛋白 (MAL)。TLR3 的信号传导则不依赖于 MyD88 和 MAL, 而是通过诱导 β 干扰素的含有 TIR 区的衔接蛋白 (TRIF)。TLR4 通过 MAL 和 TRIF 相关的衔接分子 (TRAM) 来分别招募 MyD88 和 TRIF。MAL 通过 4,5-二磷脂酰肌醇结合区定位在细胞质膜上, 而 TRAM 通过其 N 端的豆蔻酰化固定, 这些衔接蛋白的信号传导最终导致核因子- κ B (NF- κ B) 或干扰素调控因子 3 (IRF3) 的激活^[4]。

NLRs 是一个比较大的受体家族, 在人体含有 20 多种, 包括结合核苷酸的寡聚化区域 1 (NOD1), 结合核苷酸的寡聚化区域 2 (NOD2), 含有 NACHT 区、LRR 区和 PYD 区的蛋白 (NALPs), ICE 蛋白酶激活因子 (IPAF) 和神经元凋亡抑制蛋白 (NAIP)。NOD 蛋白识别细菌肽聚糖 (PGN) 的不同部分, 然后通过受体相互作用蛋白 (RIP2) 激活 NF- κ B 或者通过 CARD9 激活丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK)。NALPs 和 IPAF 被激活后形成多分子的复合体即炎症小体, NALP3 招募衔接分子含有 CARD 的斑点状的细胞凋亡相关蛋白 (ASC), 后者再招募蛋白酶原 1, 该蛋白酶原通过自动催化的切割而激活。激活后的蛋白酶 1 催化白介素-1 β (IL-1 β) 前体水解成活性的细胞因子而被释放^[4]。

CLRs 家族成员的激活可以诱导前炎症细胞因子的产生, 促进吞噬作用和引起呼吸的爆发。非受体型酪氨酸激酶 (SYK) 和树突状细胞相关性 C 型植物血凝素-1 (Dectin-1) 中的基于酪氨酸激活模块的免疫受体 (ITAMs) 的磷酸酪氨酸酶相互作用或者参与信号传导来起始依赖于 CARD9 的 BCL-10-MALT1 复合物的激活。这个复合物接着通过激活 IKK 复合物来起始 NF- κ B 的信号传导。表达在骨髓样细胞上触发受体 (TREM) 蛋白也和包含 ITAMs 的衔接蛋白相互作用来起始 CARD9

的信号传导。CLRs 引发 MAPK 的激活, 然后调控前炎症细胞因子的产生, 而在骨髓样细胞中, *dectin-1* 则通过引起活化的 T 细胞的核因子 (NFAT) 的激活来调控前炎症细胞因子的产生^[4]。

1.2 Toll 样受体

20 世纪末, Toll 最先被认为是果蝇抵抗真菌感染必需的受体^[5]。一年以后, 哺乳动物中的一个 Toll 受体的类似物 (现被命名为 TLR4) 被发现可以诱导一系列基因的表达, 产生炎症反应^[6]。另外, 在小鼠模型中, 定点突变后的 *Tlr4* 基因对 LPS 没有反应^[7]。这些研究使得天然免疫成为一个研究的热点, 而且近年来随着研究的深入, TLRs 识别微生物病原菌的机制以及下游的信号传导途径都取得了很大进展。

1.2.1 Toll 样受体成员及配体

在哺乳动物的第一个 TLR, TLR4 被发现后, 和 TLR4 结构上相关的几个蛋白也被鉴定出来然后命名为 Toll 样受体^[8]。至今为止, 在人类中有 10 个 TLRs 被鉴定, 分别是 TLR1~TLR10, 在老鼠中, 有 12 个 TLRs 被鉴定, 分别是 TLR1~TLR9、TLR11、TLR12 和 TLR13。TLR1~9 在老鼠和人类中都很保守, TLR10 由于逆转录酶病毒的插入, 使得 TLR10 在老鼠中没有功能。在人类的 *tlr11* 基因上有一个终止密码子, 导致 TLR11 在人类中没有表达^[9]。

TLRs 是一类 I 型的跨膜糖蛋白, 分子量大约在 90~115KD, 由膜外的负责结合配体的亮氨酸重复区 (LRR) 和膜内的负责信号传导的 TIR 结构域组成^[10]。LRR 结构域有 19~25 个串联的 LRR 模块组成, 每个模块包含 24~29 个氨基酸, 含有保守的氨基酸序列 XLXXLXLXX, 由 β 折叠和 α 螺旋以环连接组成。

根据在细胞内的定位和识别的 PAMP, TLRs 主要可以分为两个亚组。一组包括 TLR1、TLR2、TLR4、TLR5、TLR6 和 TLR10, 该组受体表达在细胞膜上, 主要识别微生物的膜组件例如脂类、脂蛋白和蛋白质; 另一组由 TLR3、TLR7、TLR8 和 TLR9 组成, 该组受体表达在胞内的囊泡内例如内质网, 核内体, 和溶酶体, 主要识别微生物的核酸 (见图 1-3)。

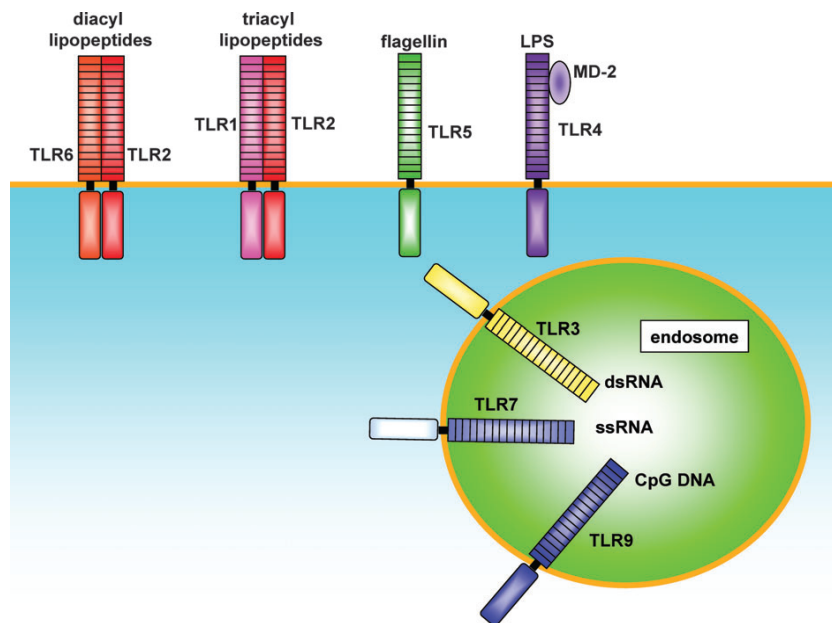


图 1-3. Toll 样受体和它们的配体

Fig.1-3. TLRs and their ligands

资料来源: Kiyoshi Takeda et al. International Immunology; Vol. 17; No. 1; pp. 1–14.

各种受体的特异性配体也都被鉴定出来（见图 1-3）。TLR4 可以识别革兰氏阴性菌的 LPS^[11]。TLR2 和 TLR1 或 TLR6 联合可以识别不同的细菌组分，包括革兰氏阴性菌的肽聚糖，脂多肽和脂蛋白以及支原体的脂多肽^[12]，TLR2 和 TLR1 的异源二聚体识别三酰基脂多肽而 TLR2 和 TLR6 的异源二聚体则识别二酰基脂多肽^[13]。TLR3 识别许多病毒复制时产生的双链 RNA^[14]。TLR5 识别细菌的鞭毛蛋白^[15]。TLR7 识别合成的咪唑喹啉样的分子，鸟嘌呤核苷的类似物，来源于人类免疫缺陷病毒 1（HIV-1），疱疹性口炎病毒（VSV）和流感病毒的单链 RNA^[16]以及一些 siRNAs^[17]。TLR8 识别咪唑喹啉和单链 RNA^[18]。TLR9 识别细菌及病毒的 CpG DNA 模块和疟原虫色素^[19]。

1.2.2 TLR 信号传导途径中含有 TIR 结构域的衔接蛋白

TIR（Toll/interleukin-1 receptor）结构域（TIR domain）是TLR信号传导途径所特有的，存在于TLRs的胞内部分和下游的衔接蛋白中，TLRs信号传导的实现主要依靠该结构域的相互作用。已经发现5个含有TIR结构域的衔接蛋白，分别是MyD88（myeloid differentiation primary-response gene 88）、MAL（MyD88-adaptor-like又称TIRAP）、TRIF（TIR-domain-containing adaptor protein inducing IFN- β 又称TICAM1）、TRAM（TRIF related adaptor molecule又称TICAM2）和

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库